

In-situ microscope probe and measuring system - comprises optical microscope coupled to an image-analysing computer

Patent Number: DE4032002

Publication date: 1991-06-06

Inventor(s): SUHR HAJO DR (DE); SPEIL PETER DIPL ING (DE); WEHNERT GERD DIPL CHEM DR (DE); STORHAS WINFRIED DIPL ING (DE)

Applicant(s):: ABB PATENT GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ DE4032002

Application Number: DE19904032002 19901009

Priority Number (s): DE19904032002 19901009; DE19893933909 19891011

IPC

Classification: C12M1/34 ; C12M3/00 ; G01N15/06 ; G02B21/00

EC Classification: G01N21/47F, C12M1/34H, G02B21/00M3

Equivalents:

Abstract

Microscopic imaging and image evaluation by means of optical microscopy is used for in-situ analysis of a biological culture (4) in motion or at rest. The moving or stationary culture (4) in a biological reactor (1) is analysed with the help of a microscope (2) and a video-camera (51). The microscopic image formed by the video-camera (51) is processed by a computerised digital imaging system (52), which measures the cell concentration in the culture (4) as well as other parameters, and is used immediately for control of the biological process in the reactor (1).

USE/ADVANTAGE - Used for characterising biological cultures, esp cultures which are contained in a reactor vessel. It is applicable for example where the rate of multiplication of cells or the rate of increase of biomass is to be monitored and controlled. The proposed system allows cell concn to be measured directly,, and therefore with greater accuracy.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

(12) Patentschrift
 (10) DE 40 32 002 C 2

(51) Int. Cl.⁸:
C 12 M 1/34
 G 01 N 15/06
 G 02 B 21/00

- | | | |
|----|--|------------------|
| 21 | Aktenzeichen: | P 40 32 002.2-41 |
| 22 | Anmeldetag: | 9. 10. 90 |
| 43 | Offenlegungstag: | 6. 6. 91 |
| 46 | Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: | 22. 5. 97 |

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

- ③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①

11.10.89 DE 39 33 909.2

- 73 Patentinhaber:**

Suhr, Hajo, Prof. Dr., 69121 Heidelberg, DE

- ⑦2 Erfinder:

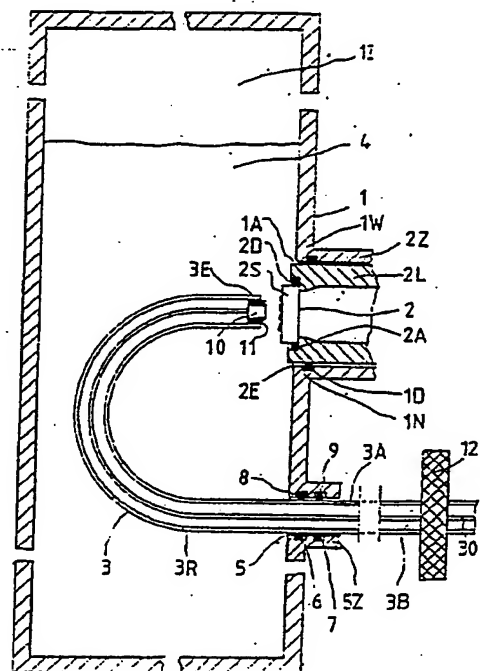
Suhr, Hajo, Dr., 69121 Heidelberg, DE; Speil, Peter, Dipl.-Ing., 69123 Heidelberg, DE; Wehnert, Gerd, Dipl.-Chem. Dr., 69115 Heidelberg, DE; Storhas, Winfried, Dipl.-Ing., 67317 Altleiningen, DE

- ⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

EP 34 582 B

- ## ⑤4 In situ Mikroskopsonde und Meßverfahren

- (51) Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Zellen in einer Kulturbrühe (4) oder von anderen Partikeln in bewegten oder ruhenden Medien mit einem Mikroskop (20), dem eine Videokamera (51) nachgeschaltet ist, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe des Mikroskops (20) und der nachgeschalteten Videokamera (51) die strömende oder ruhig gestellte Kulturbrühe (4) in einem Bioreaktor (1) aufgenommen und mit Hilfe einer computergestützten, digitalen Bildverarbeitungseinrichtung (52) die Konzentration der Zellen in der Kulturbrühe (4) oder der anderen Partikel bestimmt und zur Steuerung des Bioprozesses im Bioreaktor (1) unmittelbar benutzt wird.



DE 40 32 002 C 2

DE 40 32 002 C 2

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruches 1, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Ein solches Verfahren kommt dort zum Einsatz, wo in einem abgeschlossenen System, beispielsweise in einem Bioreaktor, lebende Zellen bei einer bestimmten Temperatur und vorgegebenen Reinheitsbedingungen vermehrt werden. Um die Vermehrung der Zellen bzw. das Anwachsen der Biomasse im Reaktor kontrollieren zu können, werden zur Zeit Streulicht- oder Fluoreszenzsonden verwendet. Bei diesen Vorrichtungen wird die Kulturbrühe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, und die Intensität des hervorgerufenen Streulichts bzw. des Fluoreszenzlichts mit einem Fotodetektor bestimmt. Aus der Intensitätsänderung des Lichtes bzw. auf Grund der durch die Zellen hervorgerufenen Fluoreszenz kann auf die Konzentration der Biomasse bzw. der Zellen in dem Bioreaktor geschlossen werden. Die bis jetzt zur Ermittlung der Zellenkonzentration in den Bioreaktoren verwendeten optischen Sonden erfassen summarisch alle streuenden bzw. fluoreszierenden Bestandteile eines repräsentativen Probevolumens. Die ermittelten Werte müssen daher mit Hilfe eines standardisierten Prozesses kalibriert werden und erlauben nur dann korrekte Messungen, wenn jeder Meßprozeß hinsichtlich seiner Bestandteile immer den gleichen Meßuntergrund aufweist. Der Meßuntergrund einer Kulturbrühe in einem Bioreaktor wird durch die sich dort bildenden Gasblasen, den Festkörper, die Nährsubstanzen oder aber auch durch eine variierende durchschnittliche Größe der Zellen erzeugt. Die zuletzt genannten Faktoren können zu einer erheblichen Störung des Meßverfahrens und damit zu einer Verfälschung der Meßdaten führen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren aufzuzeigen, mit dem eine fehlerfreie Ermittlung der Zellenkonzentration einer Kulturbrühe durchgeführt werden kann, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zu schaffen.

Das Verfahren, mit dem diese Aufgabe gelöst wird, ist in Patentanspruch 1 offenbart.

Die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ist in Patentanspruch 3 offenbart.

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, eine Kulturbrühe, z. B. in einem Bioreaktor, mikroskopisch zu überwachen. Durch den zusätzlichen Einsatz einer Videokamera und einer Vorrichtung, mit der eine Strömungsberuhigung der Kulturbrühe innerhalb des Bioreaktors durchgeführt werden kann, können zu jedem beliebigen Zeitpunkt Bilder der Kulturbrühe erzeugt und die Konzentration der lebenden Zellen in der Kulturbrühe hieraus ermittelt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt die mikroskopische Betrachtung einer dünnen Volumenschicht innerhalb des Bioreaktors mit einer Mikroskopsonde, nachfolgend auch Meßsonde genannt. Die Kulturbrühe kann in Durchlicht und Aufsicht mikroskopiert werden. Ebenso ist Fluoreszenzmikroskopie möglich, wenn das abgegrenzte Volumen der Kulturbrühe mit einer Anregungswellenlänge von 340 bis 365 nm bestrahlt wird. Das Objektiv des Mikroskops kann unmittelbar vor dem Reaktorfenster angeordnet werden. Falls es die Gegebenheiten erlauben, kann die Meßsonde durch einen Normstutzen auch unmittelbar in den

Reaktor eingeführt werden, wobei das Meßfenster direkt durch das Mikroskopobjektiv gebildet werden kann. Auf die Objektivfrontlinse wird dazu ein Deckglas aufgekittet.

Eine Sterilisierung der Mikroskopsonde kann hierbei dann auf chemischem Wege erfolgen. Die Mikroskopsonde wird in diesem Fall unter Verwendung einer Wechselsonde in den Reaktor eingeführt.

Das mit Hilfe des Mikroskops erhaltene Bild erzeugt leuchtende Strukturen auf einem dunklen oder diffusen Hintergrund. Dieses Bild kann über eine Videokamera einer automatischen Bildverarbeitungsvorrichtung zugeführt werden, in der eine Auswertung des Bildes erfolgt. Bei der Auswertung des Bildes wird die Anzahl der beleuchteten Objekte erfaßt. Diese entspricht der Anzahl der Zellen in dem betrachteten, abgegrenzten Volumen. Aus der Anzahl der Zellen in dem betrachteten Volumen ergibt sich die Konzentration der Zellen in der Kulturbrühe des Bioreaktors. Die Abgrenzung des Probevolumens innerhalb des Bioreaktors erfolgt durch ein Schärfe- bzw. Kontrastkriterium, das in der digitalen Bildverarbeitung des Mikroskopbildes einprogrammiert wird. Nur diejenigen Objekte werden mitgezählt, deren Kanten genügend scharf hervortreten, deren Abbildungsschärfe oder Kontrast also oberhalb einer zweckmäßig gewählten Minimalschärfe bzw. einem Minimalkontrast liegen. Die Schwellenwerte für Kantencharakteristik, Schärfe und Kontrast können innerhalb der digitalen Bildverarbeitung numerisch definiert werden. Auf diese Weise werden nur Objekte gezählt, die sich innerhalb einer definierten Entfernung von der Gegenstandsebene des Mikroskops befinden. Das eigentlich untersuchte Volumen ist also der Bereich, der durch das Mikroskop mit definierter Schärfe abgebildet wird. Seine Größe wird durch eine Eichmessung mit einer wohlbekannten Konzentration von Zellen bestimmt. Die in einem Bioreaktor enthaltene Kulturbrühe kann auch außerhalb desselben in einer Durchflußzelle überprüft werden. Zu diesem Zweck wird an den Bioreaktor eine Durchflußzelle angeschlossen, die von der Kulturbrühe durchströmt werden kann.

Neben einer Beobachtung und Analyse von lebenden Zellen in einem Bioreaktor können die erfindungsgemäße Vorrichtung und das Verfahren auch unabhängig vom Bioreaktor zur Analyse kleiner Teilchen in bewegten oder ruhenden Medien Anwendung finden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von schematischen Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine spezielle Ausführungsform der Beleuchtungs- und Abtrennvorrichtung des erfindungsgemäßen Bioreaktors,

Fig. 2 eine spezielle Ausführungsform des Fensters für das Mikroskopobjektiv,

Fig. 3 eine Variante der in Fig. 2 dargestellten Vorrichtung,

Fig. 4 die vollständige Vorrichtung in der speziellen Ausführungsform für Aufsicht-Belichtung,

Fig. 5 eine mit dem Bioreaktor in Verbindung stehende Durchflußzelle.

Fig. 1 zeigt einen Bioreaktor 1, in dem lebende Zellen in einem Nährmedium kultiviert werden können. Der Bioreaktor 1 weist ein Fenster 2 auf. Im Bereich dieses Fensters 2 ist eine Vorrichtung 3 installiert, mit der eine definierte Menge der zu untersuchenden Kulturbrühe 4 vom Inhalt 11 des Bioreaktors 1 abgetrennt und vor dem Fenster 2 angeordnet werden kann. Die Vorrichtung 3 wird durch ein Rohr 3R gebildet, das U-förmig gebogen und bei der hier dargestellten Ausführungs-

form aus Edelstahl gefertigt ist. Das Fenster 2 des Bioreaktors 1 wird bei dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel durch eine kreisförmige Öffnung 2E begrenzt, die nach außen hin einen zylinderförmigen Ansatzstutzen 2Z aufweist. Dieser kann, wie bei dem hier dargestellten Ausführungsbeispiel, als Normstutzen mit einem Durchmesser von 25 mm ausgebildet werden. In den Ansatzstutzen 2Z ist ein zylinderförmiger Einsatz 2L eingesetzt. Das dem Inneren des Bioreaktors zugewandte Ende des Einsatzes 2L ist durch eine durchsichtige Scheibe 2S verschlossen. Diese kann aus Glas oder Quarz gefertigt sein. Die Scheibe 2S ist bereichsweise in eine ringförmige Ausnehmung 2A des Einsatzes 2L eingefügt und von einer ringförmigen Dichtung 2D umgeben, so daß ein hermetischer Abschluß des Bioreaktors 1 im Bereich der Scheibe 2S gegeben ist. Die Öffnung 2E des Bioreaktors 1 weist in der Wand 1W eine Ringnut 1N auf, die zu dem Einsatz 2L hin offen ist. In diese Ringnut 1N ist eine ringförmige Dichtung 1D eingefügt, so daß ein hermetischer Abschluß des Bioreaktors 1 zwischen dem Einsatz 2L und der zylinderförmigen Verlängerung 2Z nach außen hin gegeben ist. In definiertem Abstand von dem Fenster 2 ist in der gleichen Wand 1W eine weitere Öffnung 5 vorgesehen. Diese weist eine zylinderförmige Verlängerung 5Z auf, die nach außen gerichtet ist. Ein Arm 3A des Rohres 3R ist durch die Öffnung 5 nach außen geführt, und steht etwa 10 cm über die Öffnung 5 nach außen über. Im Bereich der Öffnung 5 und der zylinderförmigen Verlängerung 5Z sind in definiertem Abstand ringförmige Dichtungen 6 und 7 angeordnet, die das Rohr 3R eng umschließen. Die beiden Dichtungen 6 und 7 sind in je einer Ringnut 8 und 9 angeordnet, die im Bereich der Wand 1W des Bioreaktors 1 bzw. der zylinderförmigen Verlängerung 5Z angeordnet sind. Die U-förmige Krümmung des Rohres 3R ist innerhalb des Bioreaktors angeordnet. Der Krümmungsradius 3R des Rohres ist so gewählt, daß das zweite freie Ende 3E des Rohres 3R in gleicher Höhe wie das Fenster 2 angeordnet ist. In das freie Ende ist ein scheibenförmiges, durchsichtiges Bauelement 10 eingesetzt, das ein Fenster bildet. Das Fenster 10 ist von einer ringförmigen Dichtung 11 umgeben, die geringfügig aus dem freien Ende 3E nach außen übersteht. Das Fenster 10 ist bei der hier dargestellten Ausführungsform aus Glas oder Quarz gefertigt. Die Dichtung 11 ist aus einem elastischen Material gefertigt. Das Fenster 10 kann so angeordnet werden, daß sein Mittelpunkt in einer Ebene mit dem Mittelpunkt des Fensters 2 in der Wand 1W liegt. An dem außerhalb des Bioreaktors 1 angeordneten Arm 3A des Rohres 3R ist ein Manipulator 12 befestigt. Mit dessen Hilfe kann das Rohr 3R über eine Führung (hier nicht dargestellt) in dem Bioreaktor 1 bewegt werden. Wird der Arm 3A nach außen gezogen, so bewegt sich das Ende 3E innerhalb des Bioreaktors in Richtung auf das Fenster 2. Da die Dichtung 11 geringfügig aus dem Ende 3E hervorsteht, kann mit dem Manipulator 12 eine geringe Menge der im Bioreaktor befindlichen Kulturbrühe zwischen dem Fenster 2 und dem Fenster 10 eingeschlossen und damit ruhiggestellt werden. Ist die mikroskopische Messung an der vor dem Fenster 2 angeordneten Kulturbrühe 4 abgeschlossen, so wird mit Hilfe des Manipulators 12 der Arm 3A weiter in den Bioreaktor hineingeschoben, so daß die beobachtete Menge an Kulturbrühe 4 wieder dem übrigen Volumen der Kulturbrühe 4 zugeführt wird. Durch ein neues Herausziehen des Armes 3A kann zu einem späteren Zeitpunkt wiederum eine kleine Menge der Kulturbrühe 4 zwischen dem Fenster 10 und dem Fenster 2

ruhiggestellt werden. Falls die Innenseite des Fensters 2 durch die Kulturbrühe 4 verschmutzt ist, kann mit Hilfe der Dichtung 11, die sich am Ende 3E des Rohres 3R befindet, das Fenster 2 gereinigt werden. Hierzu wird das Ende 3E zunächst vor der Scheibe 2S positioniert. Anschließend wird der Manipulator 12 im oder gegen den Uhrzeigersinn gedreht.

Wie in Fig. 2 dargestellt, kann vor dem Fenster 2 des Bioreaktors 1 auch das Objektiv 21 eines Mikroskops 20 angeordnet werden. Hierzu wird das Objektiv 21 zusammen mit dem Tubus 22 des Mikroskops 20 in die zylinderförmige Verlängerung 2Z in der Öffnung 2E eingesetzt. Anstelle des Fensters 2 bzw. der Scheibe 2S kann auch das Objektiv 21 eines Mikroskops 20 dauerhaft installiert werden, wie es in Fig. 3 dargestellt ist. In diesem Fall bildet das Objektiv selbst das Fenster. Um einen hermetischen Abschluß des Bioreaktors 1 auch bei dieser Ausführungsform zu erreichen, ist zwischen dem zylinderförmigen Ansatzstutzen 2Z des Bioreaktors 1 und dem Tubus 22 des Mikroskops 20 eine ringförmige Dichtung 23, beispielsweise ein O-Ring angeordnet, der in der Ringnut 24 des Tubus 22 angeordnet ist.

Fig. 4 zeigt den Bioreaktor 1 wiederum im Bereich seines Fensters 2. Vor dem Fenster 2 ist das Mikroskop 20 mit seinem Objektiv 21 angeordnet. Das Mikroskop 20 steht mit einer Lichtquelle 50 in Verbindung. Diese kann beispielsweise als gepulste UV-Lichtquelle ausgebildet werden. Um Fluoreszenzmikroskopie durchzuführen, ist vor allem eine Lichtquelle 50 erforderlich, die Licht im ultravioletten Wellenlängenbereich aussendet. Wie anhand von Fig. 4 zu sehen ist, wird mit dem von der Lichtquelle 50 kommenden Licht, welches durch das Mikroskop 20 eingekoppelt wird, die unmittelbar hinter dem Fenster 2 des Bioreaktors 1 befindliche Kulturbrühe beleuchtet. Zur Durchführung von Fluoreszenzmikroskopie wird UV-Licht über den dichroitischen Filter 53 in den Strahlengang eingekoppelt. Das mit Hilfe des Mikroskops 20 erzeugte Bild wird einer Videokamera 51 zugeführt. Ihr Signaleingang steht mit dem Mikroskop 20 in Verbindung, während ihr Signalausgang an eine computergestützte digitale Bildverarbeitungseinrichtung 52 angeschlossen ist. Mit Hilfe der Einrichtung 52 werden die Bilder ausgewertet. Sie ermittelt automatisch die Konzentration der Zellen in der Kulturbrühe 4. Mit Hilfe der in Fig. 4 dargestellten Vorrichtung ist eine Auflichtmikroskopie auf einfache Weise möglich. Dabei ist es gleichgültig, ob das Objektiv 21 des Mikroskops vor dem Fenster 2 des Bioreaktors 1 angeordnet ist, und mit bzw. ohne aufgeklebtem Deckglas selbst das Fenster des Bioreaktors bildet. Das mit Hilfe des Mikroskops 20 erzeugte Bild wird, wie oben beschrieben, mit Hilfe der Videokamera und der digitalen Bildverarbeitungseinrichtung weiterverarbeitet und ausgewertet.

Erfindungsgemäß besteht die Möglichkeit, mit der in Fig. 4 dargestellten Vorrichtung auch scharfe Bilder von der strömenden Kulturbrühe 4 innerhalb des Bioreaktors 1 zu erzeugen. Hierzu wird die mit dem Mikroskop 20 verbundene Kamera 51 durch kurze Verschlusszeiten oder durch Blitzbelichtung so kurzzeitig belichtet, daß auch die bewegten Zellen in der Kulturbrühe 4 noch hinreichend scharf abgebildet werden. Die Kombination von Blitzbelichtung mit synchronisiertem Kameraverschluß stellt zusätzlich eine Möglichkeit dar, extrem kurze Kameraverschlusszeiten von kleiner als einer Mikrosekunde bei hoher Lichtintensität anzuwenden.

Die lebenden Zellen können selbstverständlich auch mit Hilfe von Auflicht-Fluoreszenz mikroskopiert werden. Die Fluoreszenz der mit vorzugsweise einer UV-

Wellenlänge von 340 bis 365 nm bestrahlten Mikroorganismen läßt sich bei Verwendung von Auflicht aus der Lichtquelle 50 besonders gut zur mikroskopischen Abbildung verwerten. Da lebende Zellen einen Gehalt an besonders stark fluoreszierenden Coenzymen (NADH oder NADPH) besitzen, heben sich diese Zellen durch Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 460 nm vom restlichen Medium sehr gut ab.

Falls die Lichtverhältnisse, insbesondere bei der Auflichtfluoreszenzmikroskopie mit kurzen Belichtungszeiten nicht den Gebrauch normaler Videokameras mit ca. 0,05 Lux Empfindlichkeit erlauben, kann auf Kameras mit höherer Empfindlichkeit, beispielsweise auf Restlichtkameras zurückgegriffen werden. Durch den Einsatz von Lichtverstärkern in Restlichtkameras wird eine Empfindlichkeit erzielt, die selbst bei extrem geringen Belichtungsstärken noch scharfe Abbildungen erlaubt.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist auch für Durchlichtmikroskopie geeignet. Da hierfür Licht vom Inneren 1I des Bioreaktors 1 auf das zwischen dem Fenster 2 und dem Fenster 10 angeordnete Volumen scheinen muß, ist innerhalb des Rohres 3R ein Lichtleiter 30 angeordnet, der außerhalb des Bioreaktors 1 mit einer Lichtquelle (hier nicht dargestellt) in Verbindung steht. Der Lichtleiter 30 kann an seinem vor dem Fenster 10 angeordneten Ende mit einer Miniaturkondensoroptik (hier nicht dargestellt) versehen sein. Durch das Fenster 10, das aus Glas oder Quarz gefertigt ist, wird der Lichtleiter 30 vor einem direkten Kontakt mit der Kulturbrühe 4 geschützt.

Sollte eine Mikroskopie der Kulturbrühe 4 durch das Fenster 2 des Bioreaktors 1 nicht möglich sein, so besteht die Möglichkeit, den Bioreaktor 1 an eine Durchflußzelle 40 anzuschließen, die in Fig. 5 dargestellt ist. Über eine Leitung 41 wird von dem Bioreaktor 1 (in Fig. 5 nicht dargestellt) Kulturbrühe der Durchflußzelle 40 zugeleitet. Die Durchflußzelle 40 wird durch einen durchsichtigen Zellenboden 42 gebildet, in den die Leitung 41 einmündet. Die Leitung 41 steht mit einer Leitung 43 in Verbindung, über welche die Kulturbrühe wieder aus der Durchflußzelle 40 entfernt werden kann. Die Kulturbrühe wird von der Leitung 41 aus an einem Deckglas 44 entlanggeleitet und der Leitung 43 zugeführt. Zwischen dem Deckglas 44 und dem Boden 42 der Durchflußzelle 40 ist eine Dichtung 45 aus Polytetrafluoräthylen angeordnet. Das Deckglas 44 ist über den Öffnungen 41E und 43E der Leitungen 43 und 44 positioniert. Mit Hilfe der Dichtung 45 wird sichergestellt, daß die Kulturbrühe 4 nicht zwischen dem Deckglas 45 und dem Boden 42 aus der Durchflußzelle 40 ausströmen kann. Nach oben wird die Durchflußzelle 40 von einem Rahmen 46 begrenzt, der mittig eine Öffnung 46E aufweist, durch die hindurch das Deckglas 44 voll sichtbar ist. Die Durchflußzelle 40, die in Fig. 5 in aufgespreizter Darstellung gezeigt ist, ist in ihren Abmessungen so gewählt, daß sie zwischen dem Objektiv und dem Kondensor eines Mikroskops angeordnet werden kann. Die unter dem Deckglas 44 befindliche Kulturbrühe kann mit Hilfe des Mikroskops betrachtet und anschließend beseitigt oder dem Reaktor über die Leitung 43 wieder zugeführt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Zellen in einer Kulturbrühe (4) oder von anderen Partikeln in bewegten oder ruhenden Medien mit einem Mikroskop (20), dem eine Videokamera

(51) nachgeschaltet ist, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe des Mikroskops (20) und der nachgeschalteten Videokamera (51) die strömende oder ruhig gestellte Kulturbrühe (4) in einem Bioreaktor (1) aufgenommen und mit Hilfe einer computergestützten, digitalen Bildverarbeitungseinrichtung (52) die Konzentration der Zellen in der Kulturbrühe (4) oder der anderen Partikel bestimmt und zur Steuerung des Bioprozesses im Bioreaktor (1) unmittelbar benutzt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit Hilfe der Bildverarbeitungseinrichtung (52) die Konzentration der Zellen oder Partikel als Anzahl pro Volumen bestimmt wird, wobei für die Konzentrationsbestimmung diejenigen abgebildeten Zellen oder Partikel mitgezählt werden, welche infolge ihrer Abbildungsschärfe einem definierten Volumen symmetrisch zur scharf abgebildeten Gegenstandsebene zugeordnet sind.

3. Vorrichtung mit einem Bioreaktor (1) zur Erzeugung von lebenden Zellen in einer Kulturbrühe (4) mit einem Fenster (2), einem Mikroskop (20) und einer nachgeschalteten Videokamera, insbesondere zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vorrichtung (3) zur Ruhigstellung und/oder Abtrennung einer definierten Menge der im Bioreaktor (1) enthaltenen Kulturbrühe (4), eine computergestützte, digitale Bildverarbeitungseinrichtung (52) sowie jeweils eine Lichtquelle (30, 50) für die Auflicht- und Durchlichtmikroskopie vorgesehen sind, daß das Objektiv (21) des Mikroskops (20) unmittelbar vor dem Fenster (2) des Bioreaktors (1) angeordnet ist oder das Fenster (2) des Bioreaktors (1) bildet, und daß das Mikroskop (20) mit der Lichtquelle (50) verbunden ist, deren Licht durch das Mikroskop (20) auf das Fenster (2) des Bioreaktors geleitet ist, wobei der Signalausgang des Mikroskops (20) an der Videokamera (51) angeschlossen ist, deren Ausgangssignal einer computergestützten, digitalen Bildverarbeitungseinrichtung (52) zugeführt ist, die zur Steuerung des Bioreaktors (1) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung zur Strömungsberuhigung durch ein U-förmiges, beweglich gehaltenes Rohr (3R) gebildet ist, dessen erstes Ende (3B) außerhalb des Bioreaktors (1) und dessen zweites Ende (3E) innerhalb des Bioreaktors (1) vor dem Fenster (2) desselben angeordnet und mit einer Scheibe (10) und einem elastischen Dichtungsring (11) verschlossen ist, so daß die Dichtung (11) geringfügig aus dem Ende (3E) herausragt, und daß der Krümmungsradius des Rohres (3R) so gewählt ist, daß die Scheibe (10) konzentrisch zum Fenster (2) mit der Dichtung (11) am Fenster (2) anliegend bewegbar ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Scheibe (10) aus lichtdurchlässigem Material besteht, und daß im Inneren des Rohres (3R) ein Lichtleiter (30) angeordnet ist, durch welchen Licht zur Durchlichtmikroskopie von außen einkoppelbar ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Arm (3A) des Rohres (3) durch eine Öffnung (5) in der Wand (1W) des Bioreaktors geführt ist, daß die Öffnung (5) eine zylinderförmige Verlängerung (5Z) aufweist, die nach außen gerichtet ist, daß der Durch-

messer der Öffnung (5) und der zylinderförmigen Verlängerung (5Z) geringförmig größer sind, als der Innendurchmesser des Rohres (3R), daß zwischen dem Rohr (3R), der Wand (1W) und der zylinderförmigen Verlängerung (5Z) zwei ringförmige Dichtungen (6 und 7) angeordnet sind, die bereichs-
weise in je eine ringförmige Nut (8, 9) in der Wand (1W) und der zylinderförmigen Verlängerung (5Z) eingesetzt sind, daß die Dichtungen (5 und 6) als
Gleit-O-Ringdichtungen ausgebildet sind, und daß
außerhalb des Bioreaktors (1) am Rohr (3R) ein Manipulator (12) zur Betätigung der Vorrichtung (3) befestigt ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung des Fensters (2) des Bioreaktors (1) in der Wand (1W) des Bioreaktors (1) eine kreisförmige Öffnung (2E) vorgesehen ist, an die eine nach außen gerichtete zylinderförmige Verlängerung (2Z) angesetzt ist, daß in die Verlängerung (2Z) ein zylinderförmiger Einsatz (2) eingesetzt ist, der an seinem dem Innenraum (1I) des Reaktors (1) zugewandten Ende durch ein Fenster (2S) aus Glas oder Quarz verschlossen ist, daß das Fenster (2S) in eine Ausnehmung (2A) des Einsatzes (2L) eingesetzt und von einer ringförmigen Dichtung (2D) umgeben ist, und daß der Einsatz (2L) ebenfalls von einer ringförmigen Dichtung (2D) in Form eines O-Ringes umgeben ist, der in eine ringförmige Nut (1N) eingesetzt ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bildung des Fensters (2) ein Fermenter-Normstutzen vorgesehen ist, daß der Mikroskopaufbau (20) in den dazu passenden Ansatzstutzen (2Z) eingefügt ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Mikroskop (20) zur Vereinfachung der Sterilisation in eine handelsübliche Wechselsonde für Fermenter-Normstutzen eingefügt ist.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

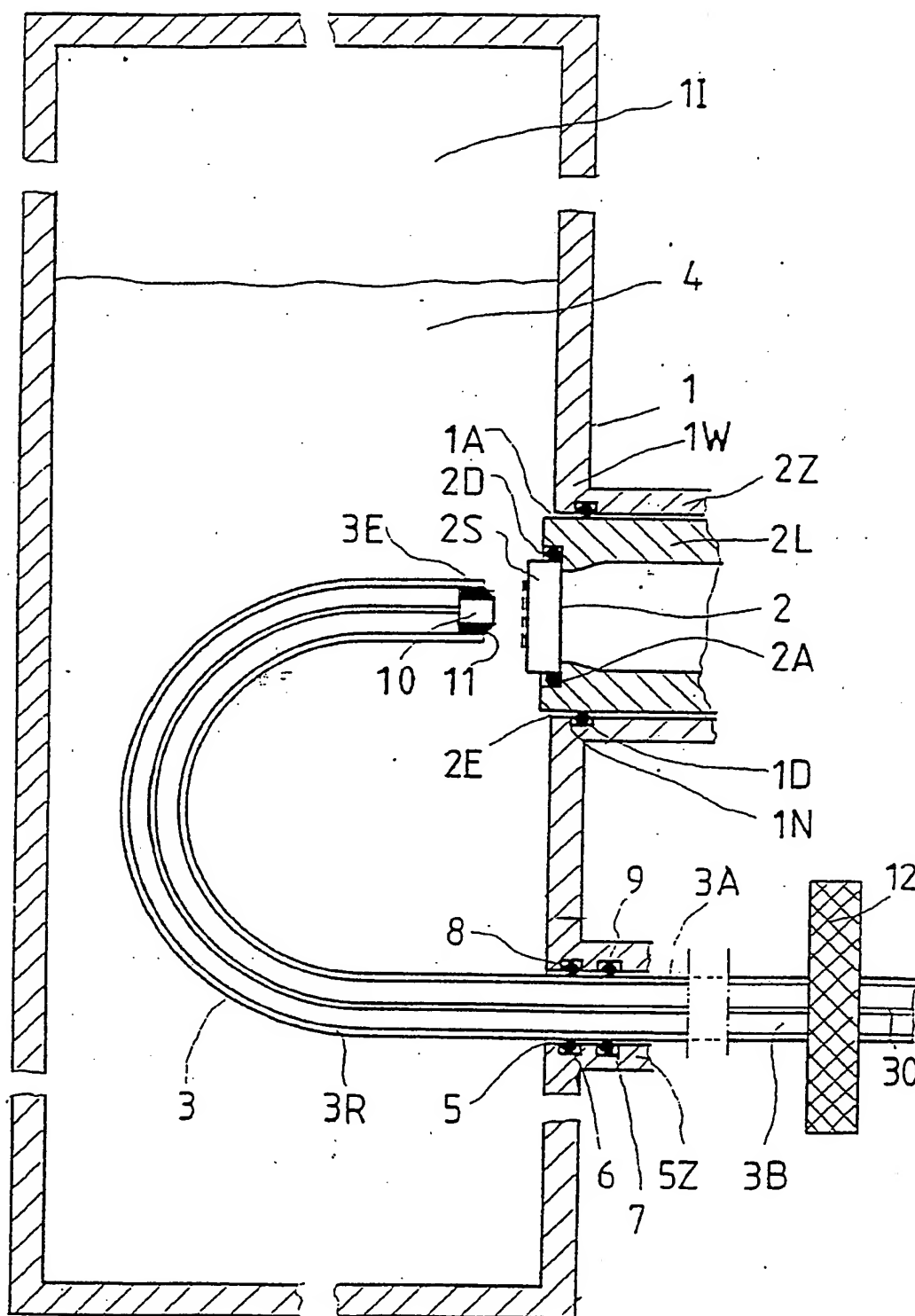


Fig.1

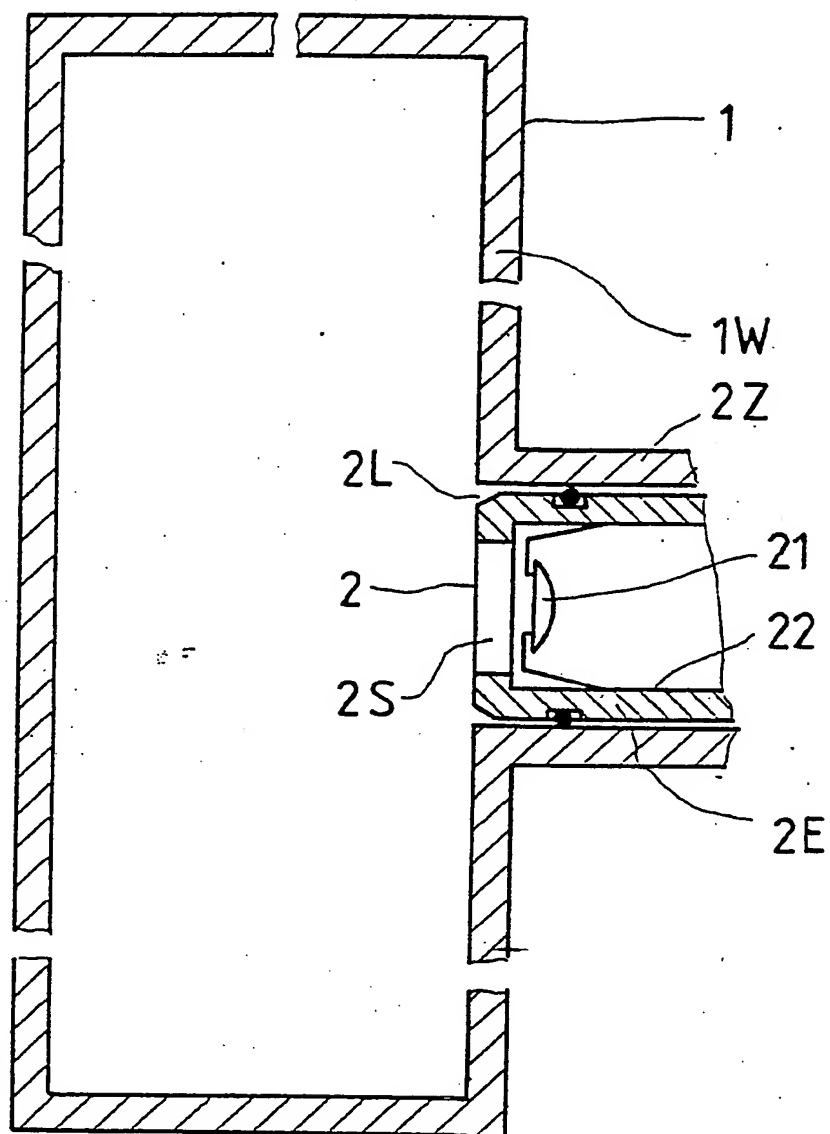


Fig. 2

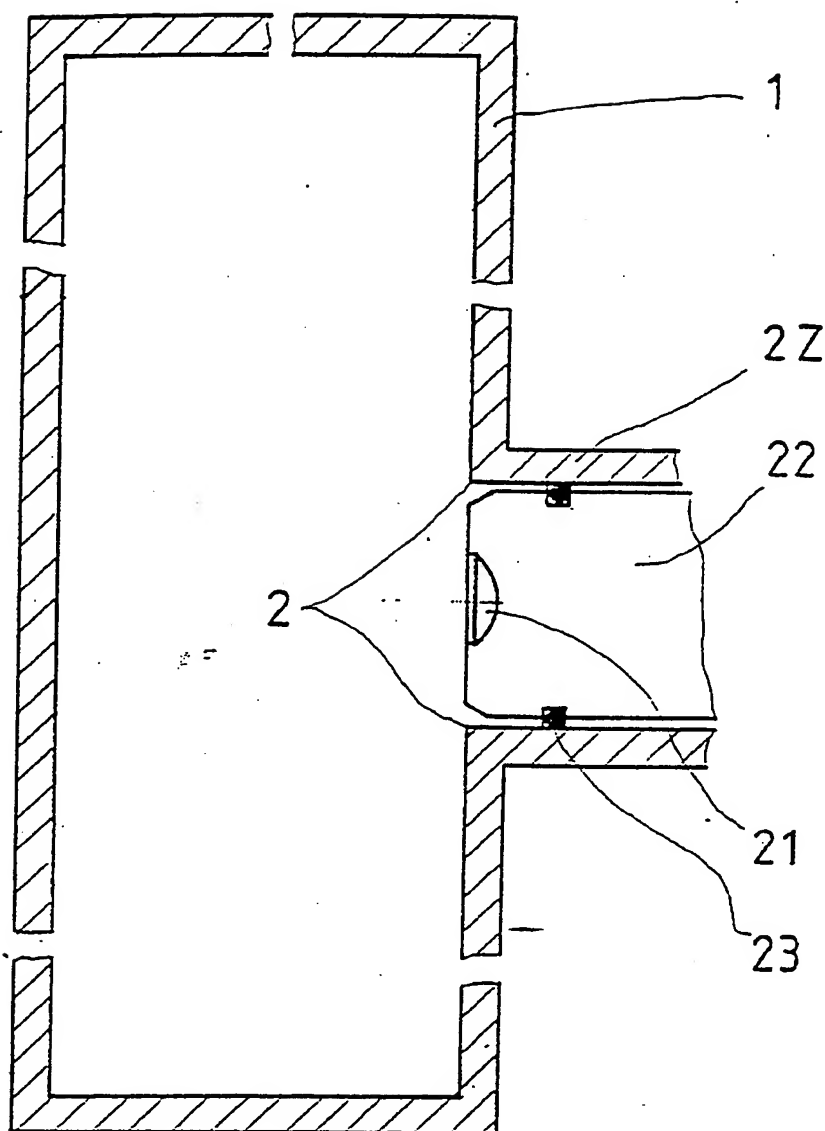


Fig. 3

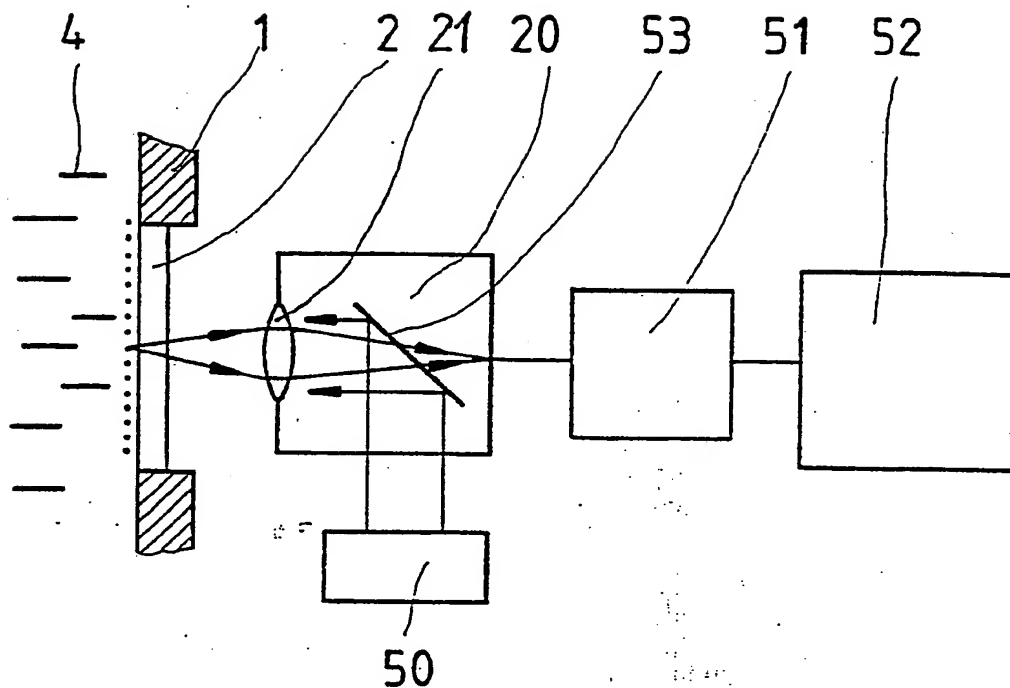


Fig. 4

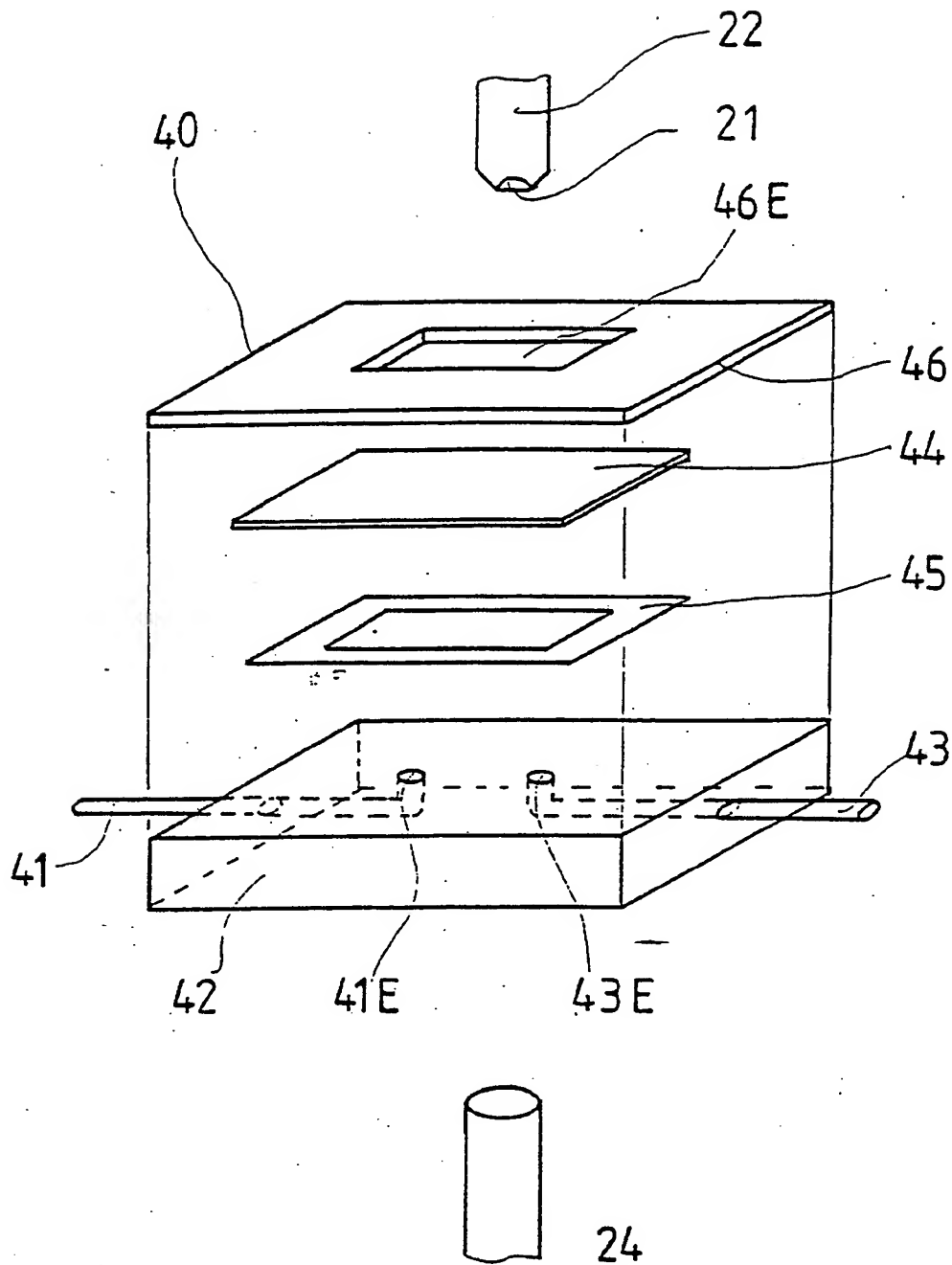


Fig.5